



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Evaluación de la expresión de las proteínas CK 17, p63 y anexina II en
líneas celulares, cultivos enriquecidos de CSC y muestras de pacientes de CaCu, por
citometría de flujo”**

T E S I S

Que para obtener el grado de

B I O L O G A

P R E S E N T A :

Luz María Santiago López

Director de Tesis: Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez

Asesor Interno: M. en C. Hugo López Muñoz

“a todas las mujeres que han muerto de CaCu y con toda la fé para quienes la padecen”.

A mi hija Natalia

Que es mi tesoro más grande. Porque su sonrisa me hace la persona más feliz del mundo.

A mi madre.

Por siempre estar a mi lado con su amor incondicional.

A mi padre.

Por todos sus sacrificios y consejos que me han convertido en lo que soy.

A mi abuela.

Quien siempre me ha dado amor y ha sido el pilar de mi familia.

A mi hermano.

Porque a pesar de todo siempre contare con su apoyo.

Agradecimientos.

Agradezco al Dr. Alejandro García Carrancá jefe del Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología – Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, donde se realizó el trabajo experimental, por darme la oportunidad de pertenecer a este equipo de trabajo y por todas las facilidades brindadas para el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez quien fungió como mi directora de tesis. Por su disposición de tiempo para asesorarme en el diseño experimental, resolver mis dudas y demás apoyo académico. Por haberme enseñado las bases para seguir desarrollándome en esta disciplina y principalmente le agradezco su amistad.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por favorecer mi desarrollo académico y profesional a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Instituto Nacional de Cancerología por permitir el desarrollo experimental en su Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer.

A María del Carmen Juárez Vázquez por su amistad incondicional, su apoyo, su alegría y su sinceridad.

A Heriberto Abraham Valencia González porque sus consejos siempre enriquecieron este trabajo y su apoyo fue esencial para la culminación de este proyecto.

A Martha, Jesús y Zully quienes a pesar de la distancia, siempre han estado junto a mí para apoyarme incondicionalmente.

A mis amigos Erika, Vincent, Paty, Pedro, Graciela, Vero, Ángel Josabad, Miriam y Silvia por todos los momentos imborrables que pasamos juntos en el laboratorio.

ÍNDICE

1. RESUMEN.	1
2. INTRODUCCIÓN.	3
2.1 Cáncer cérvicouterino.	3
2.2 Virus del Papiloma Humano.....	4
2.3 Ciclo replicativo del VPH.	6
2.4 Células Troncales.	9
2.5. Células Troncales Cancerosas.....	10
2.6 Ensayo de formación de esferas.....	11
2.7 Aislamiento de CSC de tumores sólidos.....	13
2.8 El papel de p63 en el cáncer.	14
2.9 El papel de anexina II en el cáncer.	18
2.10 CK 17 y Cáncer.	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1 Objetivo General:	24
5.2 Objetivos particulares.....	24
6. METODOLOGÍA.	25
6.1 Cultivo en monocapa.....	25
6.2 Cultivo de esferas.	25
6.3 Procesamiento de biopsias.	25
6.4 Citometría de flujo.....	26
6.5 Ensayo de tumorigenicidad <i>in vivo</i>	27
7. RESULTADOS.	28
7.1. Cultivos de esferas.....	28
7.2. Expresión de p63, CK-17 y anexina II en cultivos en monocapa y cultivos de esferas.....	29
7.3 Expresión de p63, CK-17 y anexina II en muestras de pacientes.....	33
7.4. Evaluación de tumorigenicidad <i>in vivo</i>	36
8. DISCUSIÓN.....	37

9. CONCLUSIONES.	41
10. PERSPECTIVAS.	42
11.BIBLIOGRAFÍA.	42

1. RESUMEN.

El virus del papiloma humano es el principal agente etiológico del cáncer cérvicouterino (CaCu), patología que ocupa la segunda causa de muerte en mujeres por tumores malignos en nuestro país (INEGI, 2010). Por esta razón es primordial el desarrollo de terapias más eficaces contra esta neoplasia.

En la última década, se ha identificado en algunos tumores una pequeña subpoblación de células que tienen la capacidad de regenerarlos, que son capaces de autorrenovarse y generan linajes heterogéneos (Clarke *et al*, 2006). A estas células por sus características similares con las células troncales, se les ha llamado células troncales cancerosas (CSC, de sus siglas en inglés "*Cancer Stem Cells*"). En los últimos años se han caracterizado CSC en líneas celulares (Setoguchi *et al*, 2004) y en tumores como de mama (Al-Hajj *et al*, 2003), medula ósea (Bonnet *et al*, 1997), cerebro (Singh *et al*, 2004), ovario (Szotek *et al*, 2006) colon (Dalerba *et al*, 2007), páncreas (Li *et al*, 2007), próstata (Collins *et al*, 2005), pulmón (Kim *et al*, 2005), cabeza y cuello (Prince *et al*, 2007), endometrio (Friel *et al*, 2008), entre otros.

El descubrimiento de las CSC ha llevado a proponer la hipótesis de que este grupo reducido de células malignas son las responsables de la iniciación y progresión del tumor e incluso pueden estar involucradas en la metástasis y la recurrencia tumoral (Ortiz-Sánchez, 2012). Esta hipótesis impulsa la generación de nuevas terapias antitumorales dirigidas a erradicar a estas CSC.

En la búsqueda de marcadores de CSC, algunos investigadores se han enfocado en el hecho de que las CSC y células progenitoras comparten marcadores de superficie y algunos procesos metabólicos con sus contrapartes normales. En el caso particular del CaCu no existen marcadores específicos para la identificación de las CSC. Feng y colaboradores en el 2007 identificaron y caracterizaron una población con características de células troncales en carcinomas primarios de cáncer cervicouterino a través de la generación de esferas. Estos cultivos de esferas mostraron estar enriquecidos en células CD44⁺ y CK 17⁺. En un intento

por aportar conocimientos que conlleven a la determinación de marcadores específicos para las CSC de CaCu, proponemos la evaluación de CK 17, p63 y anexina II como otros posibles marcadores de CSC de cérvix; dado que p63 parece tener un papel en el mantenimiento de la troncalidad y ha sido propuesto como marcador de células de reserva de cérvix al igual que CK17, y por otro lado anexina II está involucrada en la metástasis y progresión tumoral.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Cáncer Cérvicouterino.

A nivel mundial el CaCu ocupa el segundo lugar entre los cánceres más frecuentes, cada año aproximadamente 500 000 mujeres en todo el mundo son diagnosticadas con CaCu y más de la mitad de ellas mueren a causa de esta neoplasia. En México el CaCu es la segunda causa de muerte en mujeres por tumores, tan solo en el año 2010 se registraron 3 959 defunciones de mujeres con CaCu (INEGI, 2012). Debido a estas cifras el CaCu se considera un grave problema de salud pública.

El CaCu es una enfermedad multifactorial de transmisión sexual; cuyo agente etiológico es el virus del papiloma humano (VPH o HPV del inglés *human papillomavirus*). Además del VPH existen cofactores que estimulan el desarrollo de esta enfermedad como son el uso de anticonceptivos orales, tabaco, multiparidad e infección con *Clamidia* y otros parásitos. La detección oportuna de la presencia de una lesión premaligna previene la muerte por CaCu, siempre y cuando dicha lesión sea eliminada a través de algún procedimiento médico.

La infección con VPH puede conducir al desarrollo de lesiones premalignas denominadas LEIBG (lesión escamosas intraepitelial de bajo grado, según el sistema Bethesda) o lesiones NIC 1 (neoplasia intraepitelial cervical grado 1, de acuerdo a la clasificación de Richard), en el cérvix. Las LEIBG son manifestaciones transitorias de la infección viral productiva, que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en el tercio inferior del epitelio. Estas células muestran cambios en la relación núcleo citoplasma de las células, hipercromatización del núcleo, células binucleadas, diferencias en la citoarquitectura, presencia de cuerpos mitóticos y de coilocitos.

Es importante mencionar que la mayoría de las lesiones premalignas se generan en la zona de transición, que es la unión entre el epitelio columnar del endocérnix y el epitelio escamoso del exocérnix (Woodworth and Simpson,1993); debido al

tropismo que tiene el VPH por los queratinocitos no diferenciados expuestos en esta zona, además de que existe una disminución del número de células de Langerhans y la presencia de citocinas tipo TH2, por lo que la zona de transición es un sitio inmunosuprimido haciéndolo más susceptible a la entrada de patógenos (Ortiz-Sánchez *et al*, 2007).

La zona de transición es una región de continuos cambios metaplásicos, más activos en la pubertad y durante el primer embarazo y declinan después de la menopausia. Una LEIBG, inducida por algún tipo de VPH que se encuentre en esta región, puede progresar a una LEIAG (lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado), que en la clasificación citohistológica de Richard, equivale a NIC 2 o NIC 3, precursoras del CaCu y que se caracterizan por presentar mayor actividad mitótica y contenido de células inmaduras en los tercios central y superior del epitelio (Ramanakumar *et al*, 2010).

El tiempo que tarda en desarrollarse una lesión de bajo grado a cáncer depende de varios factores como el tipo viral, la carga viral, pero principalmente depende de los factores del hospedero como por ejemplo los factores genéticos de predisposición y del sistema inmunológico (Wang *et al*, 2003). Los tipos de VPH de alto riesgo están fuertemente relacionados con lesiones de alto grado, aunque se ha observado la presencia de diferentes tipos de VPH en una sola lesión.

2.2 Virus del Papiloma Humano (VPH).

Hasta el día de hoy se conocen más de 100 tipos virales que en relación a su capacidad oncogénica, se clasifican en tipos de alto y de bajo riesgo. Los virus de bajo riesgo son denominados de esta manera por su baja o nula capacidad de producir CaCu, sin embargo están muy relacionados con la generación de verrugas genitales o cambios muy pequeños en las células del cuello uterino.

Los VPH de “bajo riesgo” son el 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81. Los tipos 6 y 11 son los más comunes. Hay más de una docena de VPH de “alto riesgo” que se encuentran relacionados con la generación de CaCu. Los tipos

VPH de alto riesgo más frecuentes son: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 68 y 66. Los tipos 16 y 18 están relacionados con aproximadamente el 70% de los casos de CaCu (Muñoz *et al*, 2004). Este grupo de virus infectan específicamente el epitelio escamoso de piel y mucosas.

Los virus del papiloma humano pertenecen a la familia de los *Papillomaviridae*. Es un virus pequeño de 50 a 55 nm que posee una cápside icosaédrica de 72 capsómeros. El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. La cápside consta de 2 proteínas, la proteína L1 de 55 KDa y la proteína L2 de 75 kDa. El genoma viral del VPH se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR; la región que corresponde a los genes tempranos (E1 a E8) y la región que corresponde a los genes tardíos (L1 y L2). Los genes tempranos codifican para proteínas involucradas en la replicación, la transformación celular y son responsables del aumento de la proliferación de las células infectadas. La LCR, es una región no codificadora, que contiene las secuencias promotoras y potencializadoras críticas que regulan la replicación y la transcripción viral (Figura 1).

Los genes tempranos codifican para 6 proteínas con diferentes funciones. La proteína E1 coopera con la proteína E2 para mantener el genoma en estado episomal y actúa como una ADN helicasa durante la replicación del genoma viral. La proteína E2 influye sobre la transcripción y replicación del ADN viral. Adicionalmente, en tipos de alto riesgo, E2, actúa inicialmente como un supresor del promotor de los genes E6 y E7. La expresión de la proteína E4 es necesaria para la producción de la proteína L2 y además interacciona con las citoqueratinas para liberar a los viriones generados. La proteína E5 se une a factores de crecimiento y participa en la evasión del sistema inmune, desregulando la presentación de antígeno por parte de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. E6 se une a p53 a través de E6AP, una proteína ubiquitina ligasa, lo que conduce a la degradación de p53 por la vía proteosoma y a la división de células con daño en su ADN. Por su parte E7 se une a Rb evitando que forme complejo con E2F, de esta manera induce a las células a

entrar prematuramente a la fase S, mientras Rb es degradado a través de la ruta del proteasoma.

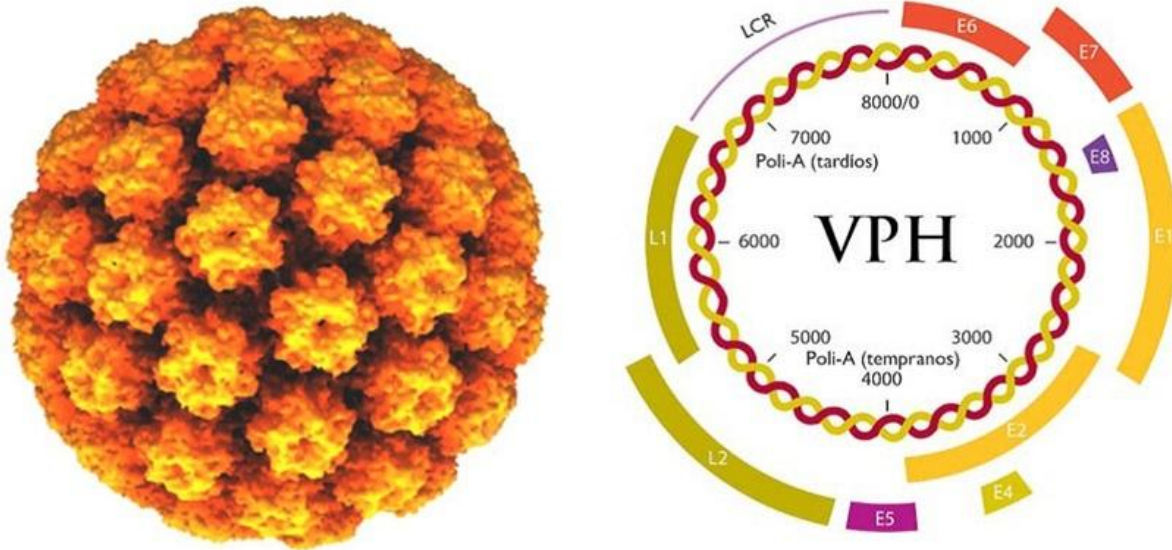


Figura 1. Genoma viral del VPH. El genoma del VPH es una molécula de ADN circular de doble cadena. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR que no contiene marco de lectura; la región temprana, que contiene a los genes E1-E7; y la región tardía que contiene a los genes L1 y L2, los cuales constituyen la cápside. (Tomado y modificado de López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006)

2.3 Ciclo replicativo del VPH.

El ciclo viral del VPH está ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El VPH inicia su ciclo viral infectando a las células basales no diferenciadas, expuestas en la zona de transformación, y/o través de microabrasiones. Una vez en contacto con las células blanco, el virión se asocia con receptores como las alfa integrinas, la heparina y las lamininas. Los viriones entran en las células epiteliales basales por endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina y/o caveolina, dependiendo del tipo de VPH (Day *et al*, 2003).

Una vez en el interior de la célula, el genoma viral es transportado al núcleo, donde se mantiene en forma episomal. Ya en el núcleo, se transcriben entonces los genes tempranos (E1, E2), lo que permite iniciar la replicación del ADN viral, a niveles bajos, utilizando la maquinaria celular. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato escamoso del epitelio, la replicación se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo y cuando las células basales se dividen, los genomas virales se reparten en partes iguales entre las células hijas. La acción conjunta de E6 y E7 produce un efecto sinérgico en la desregularización del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis. El paso final del ciclo productivo es el ensamble del virión y su maduración, que se lleva a cabo en las capas superiores del epitelio en donde es liberado, infectando así a otras células. (Frazer *et al*, 2004)

El VPH además de presentar un ciclo productivo, en donde su genoma se mantiene como un elemento episomal que conduce a la producción de partículas virales, su ADN también puede integrarse al genoma de la célula huésped, estableciendo así un ciclo viral no productivo o abortivo. La integración rompe el gen E2, provocando que E6 y E7 no estén regulados negativamente y entonces se lleva a cabo una sobreexpresión de E6 y E7 que conduce a la célula a un estado de transformación (Figura 2) (Klaes *et al*, 1999).

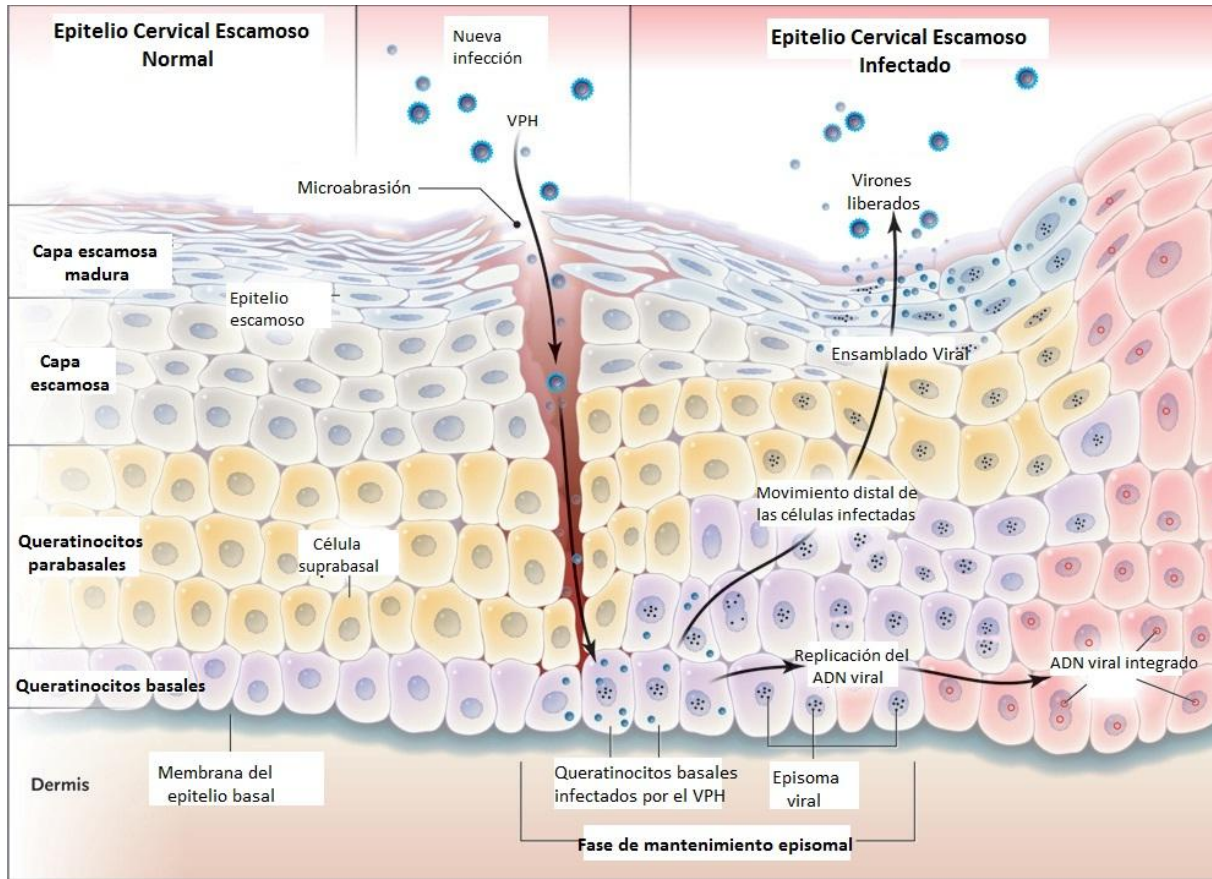


Figura 2. Ciclo viral del VPH en el epitelio escamoso. El virus del papiloma humano (VPH) infecta a los queratinocitos de la capa basal a través de microabrasiones presentes en la piel o mucosa; se transcriben entonces los genes tempranos, lo que permite realizar una replicación del ADN inicial que resulta en un número de copias de entre 50-100 genomas virales por célula. El inicio de la amplificación del genoma es seguido por una fase de mantenimiento episomal. Las células basales infectadas pasan a la capa suprabasal, donde se expresan los genes tempranos y tardíos; la amplificación del genoma se dispara en las capas terminales de diferenciación. El ensamblaje viral ocurre en la capa superior del epitelio escamoso, los viriones son liberados y pueden infectar al tejido adyacente. (Tomada y modificada de Kahn, 2009).

2.4 Células Troncales.

Una célula troncal se puede definir como una célula no diferenciada que posee la capacidad de proliferar y mantenerse en estado indiferenciado por un periodo indefinido, es capaz de autorenovarse, puede dar origen a una progenie heterogénea de células, las cuales progresivamente se diversificarán y especializarán, perdiendo su potencial de autorenovación y de indiferenciación. Por estas características, las células troncales participan en el mantenimiento y la homeostasis de los tejidos (McCulloch and Till, 2005).

Las células troncales pueden clasificarse según dos criterios: por su origen y por su potencialidad. Según su origen, las células troncales se clasifican en células troncales embrionarias, las cuales se encuentran en la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto; y las células troncales adultas, que son las responsables de generar los diversos linajes celulares que integran un tejido específico. Según su potencialidad, las células troncales pueden clasificarse como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y monopotentes. En este orden jerárquico cada estadio celular produce progenies que por un lado se renuevan a sí mismas y por el otro producen células que adquieren cada vez un mayor grado de diferenciación, al mismo tiempo, gradualmente pierden su potencial proliferativo.

Las células troncales totipotentes son aquellas que resultan tras la fecundación y pueden dar origen a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios, generando a un individuo completo. Las células troncales pluripotentes se desarrollan a partir del cuarto día después de que ha ocurrido la fertilización y pueden dar origen a los tejidos de las tres láminas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo, pero no a los tejidos extraembrionarios. Las células troncales adultas varían en su potencialidad, desde multipotenciales hasta monopotenciales (Prosper and Verfaillie, 2003). En los últimos años se han hallado células troncales en casi todos los órganos del individuo adulto: piel (Blanpain *et al*, 2004), hígado (Faris *et al*, 2001), páncreas (Bouwens and Rومان, 2005),

médula ósea (Weissman, 2000), riñón (Haller *et al*, 2005), intestino (Kitamura *et al*, 2005), vasos (Rosenzweig, 2005), sistema nervioso central (Gage *et al*, 1995), músculo esquelético (Zammit and Beauchamp, 2001), corazón (Urbanek *et al*, 2005), entre otros.

2.5. Células Troncales Cancerosas.

Recientemente varios estudios han aportado pruebas que sugieren que los tumores están organizados en una forma heterogénea y jerárquica, es decir están organizados por diferentes grupos de poblaciones con diferentes propiedades biológicas; y que la capacidad para sostener la formación del tumor y su crecimiento reside en una pequeña subpoblación celular, estas células son denominadas células troncales cancerosas o también células iniciadoras del tumor (TIC, por sus siglas en inglés "*Tumor Initiating Cells*") (Reya *et al*, 2001).

La primera evidencia de la existencia de las CSC proviene de la leucemia mieloide aguda, en donde, un subgrupo de células de aproximadamente el 0.01 % del total de la población celular eran capaces de inducir leucemia cuando se transplantaban en ratones inmunodeficientes. A partir de ahí las CSC han sido identificadas tanto en tumores sólidos como en las líneas celulares (Setoguchi *et al*, 2004) de diferentes tipos de cánceres como son de mama (Al-Hajj *et al*, 2003), medula ósea (Bonnet *et al*, 1997), cerebro (Singh *et al*, 2004), ovario (Szotek *et al*, 2006) colon (Dalerba *et al*, 2007), páncreas (Li *et al*, 2007), próstata (Collins *et al*, 2005), pulmón (Kim *et al*, 2005), cabeza y cuello (Prince *et al*, 2007), endometrio (Friel *et al*, 2008), entre otros.

Al igual que las células troncales normales, las CSC se autorrenuevan, son capaces de generar la heterogeneidad celular, presentan una mayor capacidad tumorigénica, son quimioresistentes, expresan un alto nivel de proteínas antiapoptóticas, y expresan genes como Sox2, Nanog y Oct4, relacionados con el estado de troncalidad. La capacidad para entrar en quiescencia en cualquier momento les permite escapar de las terapias convencionales contra el cáncer, lo

que conduce a la recaída de la enfermedad a pesar de que la lesión primaria se retire (Costea *et al*, 2006). Se ha observado que las CSC presentan el transportador ABCG2 que les confiere la capacidad de eliminar fácilmente las drogas utilizadas en la quimioterapia. De ahí la importancia de desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas contra las CSC para erradicar completamente el desarrollo tumoral y permitir la supervivencia de las células no tumorigénicas.

El origen de las células troncales cancerosas no está muy claro aún, algunos grupos de investigación han postulado que este grupo de células se originan directamente de las células troncales normales, dado que las células troncales son las únicas células con una vida larga, en muchos tejidos, son las candidatas naturales en las cuales podrían acumularse mutaciones y producir la transformación celular. Sin embargo este no es el único origen posible, también podrían originarse a partir de progenitoras tempranas o células ya diferenciadas (Dalerba *et al*, 2007).

En la actualidad, como se ve en la figura 3, los principales modelos de carcinogénesis son el jerárquico y el estocástico (también llamado clásico o de evolución clonal). El modelo estocástico plantea que todas y cada una de las células que constituyen un tumor tienen la potencialidad de regenerar un nuevo tumor, mientras el modelo jerárquico, recientemente desarrollado, propone que sólo una pequeña subpoblación celular tiene la capacidad de desarrollar y mantener el genotipo maligno, las CSC (Ortiz-Sánchez *et al*, 2012).

2.6 Ensayo de formación de esferas.

La demostración más convincente en la identificación de las CSC es el trasplante en modelos animales, estas células al ser trasplantadas deben generar un nuevo tumor, establecer la heterogeneidad fenotípica del tumor primario y exhibir la capacidad de autorrenovación en una serie de pasajes. Además del trasplante en modelos animales, el ensayo de formación de esferas es otra metodología utilizada para evaluar la actividad de las CSC. El ensayo de esferas es una

metodología *in vitro* que permite obtener poblaciones enriquecidas de células troncales y progenitoras tempranas. Esta metodología se basa en el hecho de que todas las células troncales (tanto normales como cancerosas) tienen la capacidad de crecer como agregados celulares (esferas) en un medio libre de suero, que contenga entre otros factores, factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) (Visvader and Lindeman, 2008).

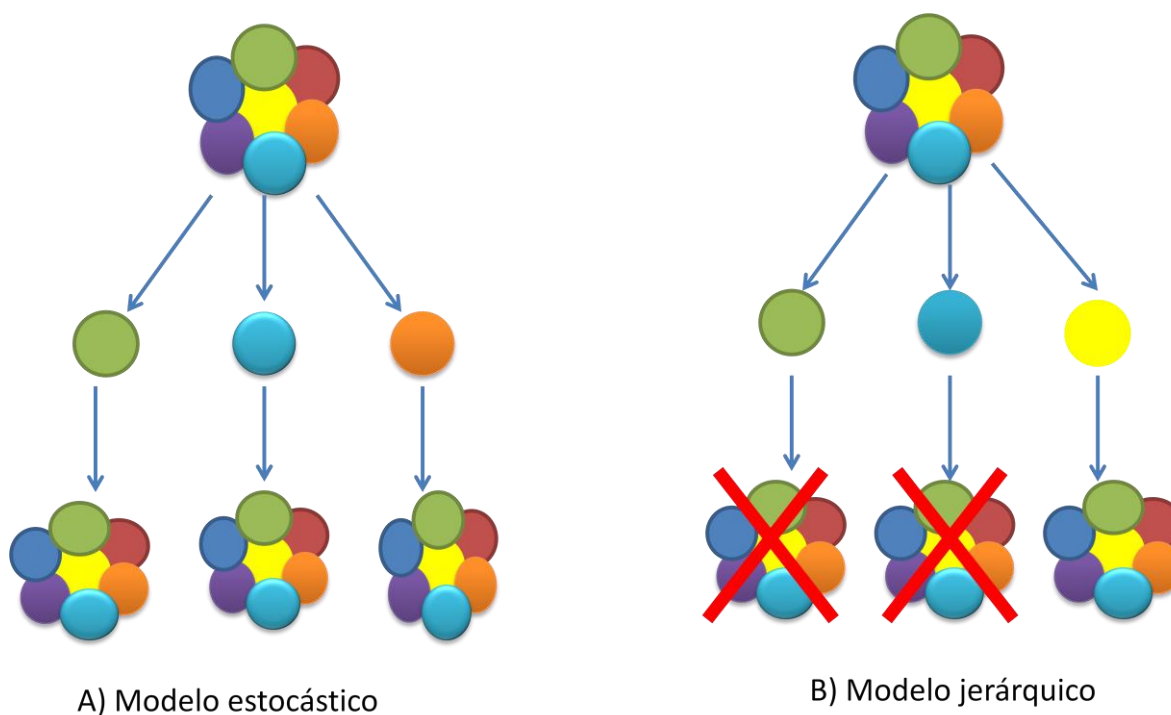


Figura 3. Modelos de carcinogénesis.

Entre los modelos que explican el desarrollo tumoral se encuentran: A) El modelo **estocástico**, el cual sugiere que los tumores son heterogéneos y cualquier célula dentro de él puede dar origen a un nuevo tumor, B) El modelo **jerárquico** propone que los tumores son heterogéneos pero solo la subpoblación de CSC tiene la habilidad para formar nuevos tumores.

El modelo de la neuroesfera ha sido ampliamente utilizado para estudiar la neurogénesis, representa el modelo de esfera mejor estudiado en términos de

clonalidad y diferenciación multipotencial. Este modelo ha sido la base para el desarrollo de esferas a partir de tejidos como cerebro (Hemmati *et al*, 2003) y mama (Dontu *et al*, 2003), entre otros.

2.7 Aislamiento de CSC de tumores sólidos.

En la última década se han identificado y caracterizado CSC en distintos tumores sólidos gracias al desarrollo de metodologías basadas en su actividad enzimática, como por ejemplo ALDH1 o en su capacidad de exclusión del colorante Hoechst y diversos marcadores de superficie.

La aldehído deshidrogenasa 1(ALDH1) es una enzima desintoxicante responsable de la oxidación de aldehídos intracelulares que tiene un papel en la diferenciación de células troncales a través de la oxidación de retinol a ácido retinóico (Ginestier *et al*, 2007), mediante la medición de la actividad de esta enzima se han aislado CSC de leucemias, de mama, de páncreas, de carcinoma de células escamosas, entre otras. Esta metodología también es utilizada para la identificación de las células troncales normales.

La capacidad de las CSC de exclusión del colorante Hoechst debido a la presencia de un mayor número de transportadores ABCG2 en esta subpoblación también ha permitido la separación de CSC. Hoeshst es un colorante fluorescente que se une al ADN, que puede ser leído mediante citometría de flujo (Bortolomai *et al*, 2010).

Entre algunos marcadores de superficie utilizados para el aislamiento de subgrupos enriquecidos en CSC, se incluyen CD133, CD44, CD24, CD90, EpCAM, ABCG5, ABCG2, entre otros. Aunque CD133 y CD44 son los marcadores de superficie más comunes y han sido utilizados para fraccionar poblaciones de CSC en distintos tumores sólidos, ninguno de estos marcadores es exclusivamente expresado por las CSC de dichos tumores, por lo que es imperante definir marcadores específicos o usar combinaciones de estos marcadores (Visvader and Lindeman, 2008). La búsqueda de nuevos marcadores

específicos para cada tipo de cáncer se basa en el hecho de que las células troncales normales y cancerosas comparten marcadores por su origen común.

Otra característica de las CSC es la expresión de los factores transcripcionales Sox2, Oct4 y Nanog que son esenciales en la regulación de la autorrenovación y la pluripotencia de las células troncales embrionarias y adultas. Además se ha visto la desregulación de la expresión de estos factores en muchos tipos de cánceres. Sox2 se expresa inicialmente en todo el blástomero, más tarde se restringe a la masa celular interna y al epiblasto, luego a las células germinales. Se ha reportado que Sox2 se expresa en células basales de cáncer de mama, en cáncer de pulmón, de páncreas, entre otros. También participa en eventos posteriores de carcinogénesis, tales como la invasión y la metástasis. Sin embargo, la reducción de la expresión de Sox2 también ha sido asociada con cáncer gástrico y coriocarcinoma. Por otro lado, Nanog y Oct4 modulan el destino de las células troncales embrionarias. En células troncales embrionarias, se encontró que Oct4 y Nanog pueden comunicarse con distintos complejos de represión para controlar la transcripción de genes (Kashyap *et al*, 2009).

2.8 El papel de p63 en el cáncer.

P63 es un miembro de la familia de factores de transcripción que tiene funciones importantes en la tumorigénesis, la diferenciación epidérmica y la autorrenovación de células troncales. Esta proteína se compone de un dominio central de unión al ADN (DBD), un dominio de transactivación (TA) y un dominio de oligomerización. Existen isoformas N-terminal e isoformas C-terminal.

Debido al uso diferencial de los dos promotores en la transcripción del gen p63 existen dos isoformas N-terminal: TAp63 y Δ Np63 que a diferencia de TAp63 no contiene el dominio TA. Además del procesamiento alternativo en el extremo 3' del mensajero de la proteína p63 da lugar a isoformas C-terminal de la proteína α , β , γ , δ y ϵ , lo que da origen a un gran número de isoformas de la proteína p63 (Figura 4).

Las isoformas de p63 se caracterizan por presentar diferentes niveles y patrones de expresión dentro de los tejidos y tumores. $\Delta Np63\alpha$ es la isoforma predominante y se expresa selectivamente en niveles altos en células basales del epitelio estratificado y glandular. Su expresión disminuye con la diferenciación celular. En algunos cánceres se ha reportado la expresión de p63 sin distinguir entre las isoformas N-terminal, como en cáncer de cuello uterino y cáncer de páncreas. La isoforma $\Delta Np63$ se expresa en células basales de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de esófago y cáncer de páncreas. La isoforma TAp63 sólo es expresada en linfomas no-Hodgkin. Ambas isoformas, $\Delta Np63$ y TAp63, se detectaron en el cáncer de vejiga, el cáncer urotelial, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma gástrico, cáncer de pulmón y timomas (Nekulova *et al*, 2011).

La homología de p63 con p53 sugiere que p63 también podría actuar como un supresor de tumores, sin embargo existen una tasa baja de mutaciones de p63 en tumores malignos que no se relaciona con esta función. Además la existencia de múltiples isoformas con funciones opuestas impiden esclarecer el papel de p63 como oncogén o supresor de tumores (Flores, 2007). Por ejemplo, en ratones KO (*knock out*) se ha observado que la pérdida de TAp63 produce un aumento en la metástasis y en el número de tumores primarios (Su *et al*, 2010).

Se ha visto que tanto TAp63 como $\Delta Np63$ son capaces de inducir senescencia celular, sin embargo este papel parece ser solo en tejidos específicos; en queratinocitos, por ejemplo la pérdida de $\Delta Np63$ o TAp63 conduce a un aumento del estado de senescencia (Guo *et al*, 2009).

También se ha reportado que la expresión desregulada de TAp63 en la epidermis produce hiperproliferación y falta de diferenciación en las capas terminales (Koster *et al*, 2004). La sobreexpresión de la isoforma $\Delta Np63$ produce un aumento en la proliferación celular, esto se debe quizá a la inhibición de los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas, p21 y p57 (Chiang *et al*, 2009).

Algunos miembros de la familia de p63 tienen efectos negativos sobre otros integrantes de la familia. Por ejemplo Δ Np63 puede ejercer un efecto negativo dominante sobre las isoformas TA de p63 y en otros miembros de la familia de p53 y TAp73, con lo que protege a las células de la muerte celular (Mundt *et al*, 2010). Otro papel negativo que tiene sobre los miembros de la familia es que puede aumentar las proteínas de choque térmico (HSP70) y esto se traduce en la disminución de la apoptosis en parte debido al secuestro de p53 (Wu *et al*, 2005). Δ Np63 también interviene en la vía AKT protegiendo a las células de la apoptosis, mediada por la regulación de la sintetasa de ácidos grasos (FASN) una enzima involucrada en el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, crítica para la supervivencia celular (Sabbisetti *et al*, 2009).

La expresión de p63 en células troncales se ha demostrado en varios tejidos incluyendo cerebro, medula ósea, músculo, piel, mama, pulmón, riñón hígado páncreas y tiroides (Nekulova *et al*, 2011). Ha sido establecido como un marcador de células basales del epitelio. Además informes recientes en modelos murinos sugieren un papel importante de este factor de transcripción en el mantenimiento del fenotipo de célula troncal del cáncer.

En carcinomas de células de cabeza y cuello, se ha visto que la isoforma Δ Np63 controla los niveles de expresión de CD44 y queratinas de la capa basal 6A y 14, conocidos marcadores de precursores inmaduros, al tiempo que reduce fuertemente la expresión de las queratinas suprabasales 4 y 19 lo que sugiere su papel en el mantenimiento de un fenotipo indiferenciado (Boldrup *et al*, 2007). La isoforma Δ Np63 también puede inducir la expresión del inhibidor de la diferenciación Id-3 que es un represor transcripcional de E-Caderina que a su vez se traduce en la inhibición de la diferenciación de las células cancerosas, que contribuye al fenotipo de la célula troncal (Higashikawa *et al*, 2009). Por otra parte, en poblaciones de células troncales de cáncer de mama, generadas a partir de líneas celulares de rata, se ha observado que p63 es esencial para mantener las características de CSC (Zuchi *et al*, 2008).

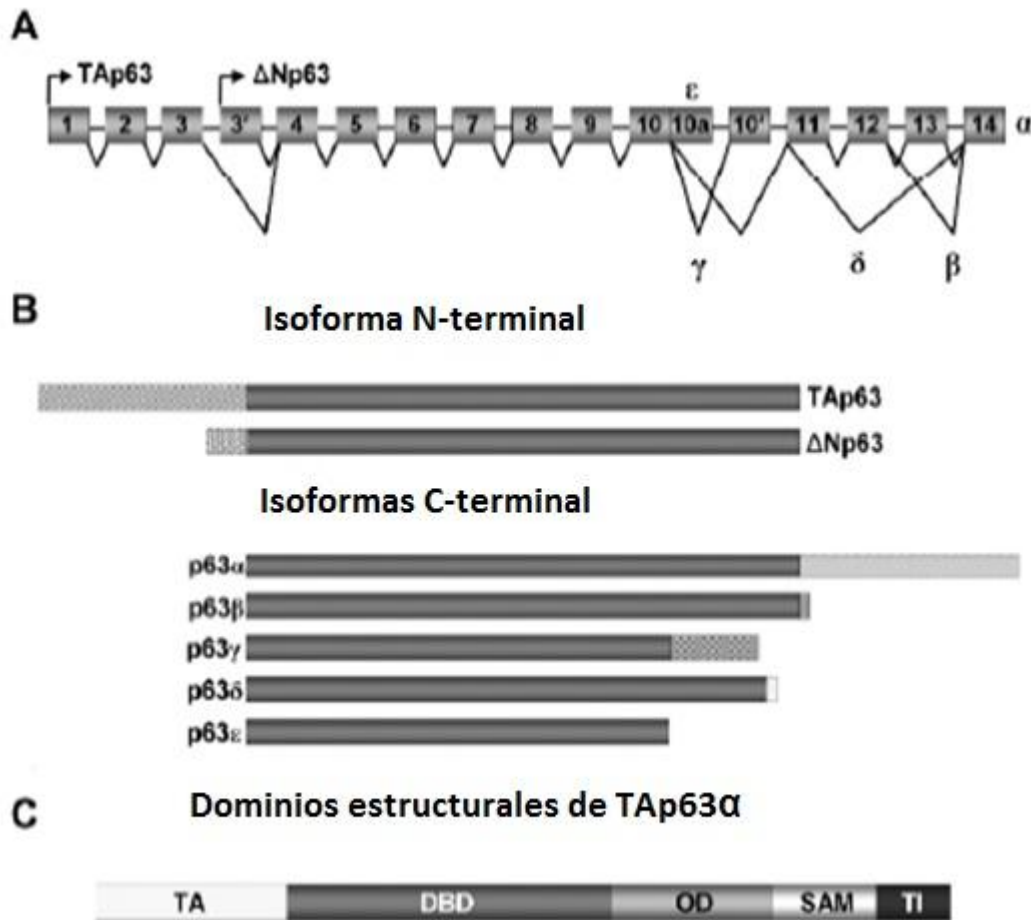


Figura 4. Estructura del gen TP63 y las isoformas de p63. (A) El gen TP63 tiene 2 promotores, además el ARNm sufre un procesamiento alternativo en el extremo 3', lo que produce un amplio espectro de isoformas de la proteína p63. (B) Debido a la transcripción de los dos promotores del gen TP63, existen dos isoformas N-terminal de p63: la forma de larga duración TAp63 y la N-terminal truncada ΔNp63. El procesamiento alternativo en la región terminal 3' del ARNm de TP63 da lugar a isoformas C-terminal de la proteína de p63:α, β, γ, δ y ε. (C) La proteína p63 consiste del dominio central de unión al ADN (DBD), del dominio de oligomerización (OD), del dominio de transactivación (TA) en la región N-terminal (solo TAp63; ΔNp63 posee dominios de transactivación alternativos); la isoforma p63α también contiene un motivo alfa estéril (SAM) y un dominio inhibidor (TI) dentro de la región C-terminal (Tomada y modificada de Nekulova *et al*, 2011).

2.9 El papel de anexina II en el cáncer.

Anexina II (A2) es el principal sustrato *in vivo* para proteínas cinasas específicas de tirosina (pp^{60src}) y cinasas serina/treonina como la proteína cinasa C (Boyko *et al*, 1994). Una característica bioquímica única de la A2, es que en la región N-terminal contiene un sitio de unión de alta afinidad a P11, que es un miembro de las proteínas de unión a calcio S100. Este complejo es conocido como el complejo heterotetramérico (dos moléculas de anexina II y dos moléculas de P11).

Aunque A2 en el citoplasma es principalmente monomérica, asociada a la membrana A2 es parte del complejo heterotetramérico. La formación de complejos con P11 aumenta la afinidad de A2 al calcio y fosfolípidos (Haijar and Krishnan, 1999), con lo que se dirige a superficie de la membrana. Además el heterotetramero A2/p11 promueve la actividad fibrinolítica en la superficie de las células endoteliales vasculares por unión plasminógeno y activador del plasminógeno tisular (tPA).

También se ha sugerido que este tetramero puede participar en la exocitosis y la endocitosis (Swairjo and Seaton, 1994). A2 ha sido implicada en varias funciones biológicas, incluyendo la transducción de señales mitogénicas, la respuesta inmune, fibrinólisis, la proliferación y la carcinogénesis (Zimmermann *et al*, 2004).

La sobreexpresión de A2 en algunos tipos de cánceres como por ejemplo: en cáncer de páncreas, cáncer de cabeza, cáncer renal, en cánceres de vagina y de cérvix, deja ver que anexina II puede tener un papel importante en el desarrollo del cáncer. Se ha visto que regula la angiogénesis, la invasión y la metástasis de las células cancerosas, mediante la interacción con el sistema plasminógeno-plasmina y sus moléculas involucradas en el proceso de fibrinólisis.

Reportes recientes indican que bajo condiciones patológicas la sobreproducción incontrolada de la plasmina en el microambiente tumoral acelera la degradación

localizada de la matriz extracelular, facilitando la invasión de las células endoteliales tumorales y la migración.

A2 no solo interacciona con el plasminógeno (precursor de la plasmina) y el t-PA (activador del plasminógeno tipo tisular), también se ha identificado que es capaz de interactuar con tenascina-C, una proteína de la matriz extracelular que interactúa con la fibronectina. Esta interacción de tenascina-C y A2 regula la adhesión local, la migración celular y la división celular. Así A2 parece ser una molécula relacionada con la progresión del cáncer y el comportamiento metastásico (Brownstein *et al*, 1998).

En ratones *knock out* se ha mostrado que A2 es un componente esencial en la neoangiogénesis. Estas observaciones fueron confirmadas por Semov y colaboradores en el 2005, quien demostró que S100A4 (proteína miembro de la familia S100) interacciona con A2 induciendo angiogénesis. Estas observaciones colocan a A2 como un eslabón importante en la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis.

Estudios recientes han mostrado la expresión selectiva de A2 en cáncer de mama invasivo. Estos resultados *in vivo* fueron respaldados con estudios *in vitro* en líneas celulares de cáncer de mama. Se mostró que las células con una alta expresión de A2 tal como MDA-MB231 fueron capaces de catalizar la conversión de plasminógeno a plasmina de manera eficiente, en cambio las células con poca capacidad invasiva como las MCF-7, células que carecen de anexina II, no fueron capaces de generar plasmina. Lo que sugiere nuevamente que anexina II es necesaria para la generación de plasmina. Además, se muestra que este mecanismo generador de plasmina es esencial para la invasión de las células MDA-MB231 y la migración (Sharma *et al*, 2006).

Existen datos que apuntan hacia una expresión selectiva de en tejido tumoral. A2 se expresa en células cancerosas de pulmón, de intestino, de cerebro, de cuello

uterino y vagina, en monocitos y macrófagos y en tejidos normales como placenta, riñón y pulmón. En contraste con esto tenemos que no ha sido encontrada en cerebro de rata ni en hígado. Es muy interesante notar que la A2 no se expresa en hígado normal sin embargo, en el daño hepático agudo, la expresión de esta proteína si existe; indicando su papel potencial en la reparación de tejidos.

En relación a su expresión en CSC, hasta el momento no existen datos reportados, pero debido a su asociación con el desarrollo de cáncer podría tener algún papel en esta subpoblación.

2.10 CK 17 y Cáncer.

El citoesqueleto de las células eucariotas se compone de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Uno de los grupos más complejos, dentro de los filamentos intermedios lo constituyen las citoqueratinas.

Las citoqueratinas componen una familia de hasta 20 polipéptidos, cuyos pesos moleculares se hallan comprendidos entre los 40 y los 68 KDa, elaboraron una clasificación numérica de estos polipéptidos en función de su peso molecular y punto isoeléctrico. De esta manera, las citoqueratinas se dividen en dos grupos: aquellas cuyo punto isoeléctrico es ácido se denominan tipo I/A (citoqueratinas 9-20), y aquellas con un punto isoeléctrico neutro-básico, tipo II/B (citoqueratinas 1-8). En muchos casos, las citoqueratinas se expresan como parejas de tipo I + tipo II, características de cada tejido.

Puesto que las células epiteliales tienen la característica de mantener su patrón de citoqueratinas durante la malignización y metástasis, éstas últimas resultan marcadores más o menos específicos de tejidos epiteliales. Es por esto que la determinación inmunohistoquímica de los tipos de citoqueratinas, ayuda a identificar el origen primario de tumores epiteliales en los que aquel se desconoce o plantea dudas.

Se ha analizado la expresión de las CK en células epiteliales normales y en células de reserva en cuello uterino, mostrando la expresión de: CK5, CK8, CK13,

CK18, CK19 y CK17. CK17 es una citoqueratina que es expresada en células de reserva y células metaplásicas inmaduras, pero no en células glandulares del epitelio cervical, ni en células escamosas metaplásicas maduras. Su expresión conjunta con otras citoqueratinas se ha mostrado estar en relación con la progresión en neoplasias principalmente, mostrando un fenotipo celular inmaduro y un estado avanzado de la enfermedad (Ikeda *et al*, 2008).

Aunque los mecanismos moleculares mediante los cuales participa en el desarrollo del cáncer y en el mantenimiento de la troncalidad aun no son muy claros, su expresión ha sido correlacionada con el desarrollo del cáncer. CK17 ha sido propuesta como un posible marcador de células troncales epiteliales, y por tanto, también podría ser un marcador de células troncales epiteliales cancerosas (Martens *et al*, 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

La mayoría de las terapias antineoplásicas actuales se han dirigido no solo a las células cancerosas sino también a las células sanas. Sin embargo la teoría de las CSC, indica que éstas sobreviven a la mayoría de las terapias convencionales contra el cáncer y pueden provocar una recurrencia tumoral. El descubrimiento de las CSC ha abierto la posibilidad de encontrar terapias dirigidas a este grupo particular de células, que aumenten el éxito en el combate contra el cáncer. A pesar de que se han propuesto posibles marcadores de las CSC de cérvix, no existen hasta el día de hoy marcadores definidos. En la búsqueda de marcadores de las CSC, los investigadores se han enfocado en el hecho de que estas células comparten marcadores con las células troncales normales.

Martens y colaboradores en el 2004 sugieren a la proteína p63 y a CK17 como marcadores de células troncales de tejido cervical normal. Feng y colaboradores en el 2009 observaron que poblaciones enriquecidas de CSC y progenitoras tempranas, generadas a partir de muestras de pacientes con CaCu, estaban enriquecidas en células CD44⁺ y CK17⁺. Por otro lado Hellman y colaboradores en el 2009 mediante estudios de proteómica observaron que anexina II se encuentra expresada cuatro veces más en CaCu, que en tejido normal de cérvix y vagina. La sobreexpresión de esta proteína permite la pérdida de adhesión a la matriz extracelular y la metástasis. Dado que p63, CK17 y anexina II presentan potencial como otros posibles marcadores de CSC de cérvix, la evaluación de su expresión en poblaciones enriquecidas de CSC de cérvix, permitirá ver su papel como posibles marcadores de CSC en cérvix.

4. HIPÓTESIS.

Si las CSC comparten marcadores con las células troncales normales, entonces se observará una mayor expresión de p63, CK17 en poblaciones enriquecidas en CSC y progenitoras tempranas, generados a partir de líneas celulares CaCu.

Si anexina II está relacionada con la pérdida de la adhesión celular y el desarrollo de metástasis en poblaciones heterogéneas de células cancerosas, su expresión se incrementará en las poblaciones enriquecidas en CSC y progenitoras tempranas derivadas de líneas celulares de CaCu.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General:

- Evaluar la expresión de las proteínas p63, CK17 y anexina II en poblaciones enriquecidas de CSC y progenitoras tempranas de CaCu.

5.2 Objetivos particulares.

- 1.-Estandarizar el cultivo de esferas generadas a partir de líneas de CaCu (cervoesferas), utilizando el medio mammosphere®.
- 2.-Evaluar por citometría de flujo la expresión de las proteínas CK17, p63 y anexina II en cultivos enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas de CaCu generados a partir de líneas celulares.
- 3.-Analizar la expresión de p63, CK17 y anexina II en muestras de pacientes con CaCu por citometría de flujo.
- 4.-Evaluar *in vivo* la tumorigenicidad de las células obtenidas de cultivos enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas de CaCu en ratones *nu/nu*.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Cultivo en monocapa.

Las líneas celulares HeLa, SiHa, CaSki y C-33 A fueron obtenidas del laboratorio de virus y cáncer del Instituto Nacional de Cancerología. Los cultivos se mantuvieron en incubación con 70 % de humedad, 5 % de CO₂ y temperatura de 37 °C. Las líneas celulares HeLa, SiHa, y C-33A fueron crecidas en medio DMEM (Dulbelco's Modified Eagle's Medium, Gibco) suplementado con 100 U/ml de bencilpenicilina (Gibco) y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco) y 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco). Mientras que la línea celular CaSki fue crecida en medio RPMI (Gibco) suplementado igualmente al 10 % con SFB y con 100 U/ml de bencilpenicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

6.2 Cultivo de esferas.

Se realizaron ensayos de formación de esferas con cada una de las líneas celulares mencionadas anteriormente. La formación de esferas se realizó a partir de cultivos en monocapa con 70% de confluencia. Las células fueron tripsinizadas y lavadas para eliminar por completo el medio. Después se disgregaron perfectamente, para posteriormente poder ser contadas en la cámara Neubauer. En cajas petri (que poseen baja adherencia) se sembraron 2×10^3 células por ml de medio Mammocul® suplementado al 10 % con el suplemento indicado (Stem Cell Technologies, Inc) y se mantuvieron en incubación con las siguientes condiciones: 37 °C, 70 % de humedad relativa y 5 % de CO₂. Después de 10 días las esferas fueron cosechadas y disgregadas con EDTA 0.05 %.

6.3 Procesamiento de biopsias.

Se trabajó con 3 biopsias de tejido cervical de mujeres que no habían sido sometidas a ningún tipo de tratamiento. Las muestras se obtuvieron de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología.

El primer paso fue lavar las muestras con PBS 1X con antibiótico y antimicóticos. Posteriormente se colocaron en una caja petri y se disgregaron mecánicamente con ayuda de navajas de bisturí, procurando obtener cortes muy pequeños. Una vez que ya no fue posible fraccionar más el tamaño de las muestras con las navajas, se adiciono aproximadamente 2 ml de PBS para resuspender con ayuda de una jeringa estéril.

Para lograr una mayor disgregación, la suspensión celular fue pasada por agujas de diferentes calibres, primero en una aguja de calibre G20 (aproximadamente 10 veces, hasta que la suspensión paso con facilidad), después en una G18 (otras 10 veces). Al momento de hacer este paso, fue importante tapar la caja petri porque las primeras veces la aguja se tapa y al forzar el pase es común que la muestra salga disparada. Después se adiciono otro ml de PBS, se resuspendió con la jeringa y se paso por un filtro de 41 micras (MQ, millipore). El disgregado se lavó con PBS con antibiótico y antimicóticos, y se centrifugó 10 minutos a 1500 rpm. La presencia de eritrocitos fue eliminada utilizando el buffer de lisis de glóbulos rojos RBC (8 % NH_4Cl , 0.1 mM EDTA, pH 7.2-7.6) en una relación 9:1 acompañado de una incubación en hielo de 10 minutos.

Después de volver a centrifugar por 10 minutos, se realizo un último lavado y se resuspendieron en 4 ml de Mammocult suplementado al 10 % con el suplemento indicado (Stem Cell Technologies, Inc). Enseguida se realizó la lectura de los marcadores por citometría.

6.4 Citometría de flujo.

Después de cosechadas, las células fueron lavadas con PBS y se contaron 4×10^5 células por cada muestra analizada. Para evaluar la expresión de p63 y CK17 previamente se realizó una permeabilización con Tritón al 0.2 % durante 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Después un lavado con buffer de citometría (BSA 0.5 %, EDTA 2 mM, PBS 1X / pH 7.2), las muestras se incubaron durante 30 min a T.A y 15 minutos en hielo con 20 μl de los anticuerpos p63 FITC (Santa Cruz, Biotechnology), CK17 (Santa Cruz, Biotechnology; dilución 1:20), anexina II (Santa

Cruz, Biotechnology; dilución 1:20) y CD49f PE (Ab Serotec) el cual fue utilizado control positivo de expresión (López *et al*, 2012). Luego las células fueron lavadas con buffer de citometría, resuspendidas y centrifugadas a 2000rpm 5 minutos.

Posteriormente as muestras para CK17 y anexina II fueron incubadas con anticuerpo secundario monoclonal anti-raton marcado con isotiocianato de fluoresceína (FICT) (Vector, Laboratories) a una dilución 1:250 durante 15 minutos a T.A, seguida por un lavado con buffer de citometría. Finalmente todas las muestras de se fijaron en paraformaldehído al 2 %. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (FAScan, Becton Dickinson), se analizaron 10 000 eventos. Para la interpretación de los datos se utilizó el programa WEASEL (desarrollado por el Instituto Walter y Eliza Hall, WEHI). Cada experimento se realizó por duplicado.

6.5 Ensayo de tumorigenicidad *in vivo*.

Después de ser disociadas mecánicamente, las células fueron contadas y lavadas con PBS y se resuspendieron en medio sin suero, para posteriormente ser inoculadas vía subcutánea en ratones desnudos de 5 a 8 semanas de edad, previamente marcados para su identificación. Se inocularon 7 ratones *nu/nu*, 2 con 1000, 2 con 50 000 y 2 con 500 000 células obtenidas de los medios enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas de CaCu (del lado derecho) contra 1000, 10 000 y 50 000 células de líneas celulares en monocapa (lado izquierdo); y como control positivo se inoculó 1 ratón con 1 000 000 de células en monocapa. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio del instituto durante dos meses después de si noculación.

7. RESULTADOS.

7.1. Cultivos de esferas.

Para la obtención de poblaciones enriquecidas de CSC y progenitoras tempranas, se desarrollaron cultivos en suspensión a partir de las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A. Se sembraron 2×10^3 células/mL en medio Mammocult®, y después de 10 días fueron cosechados.

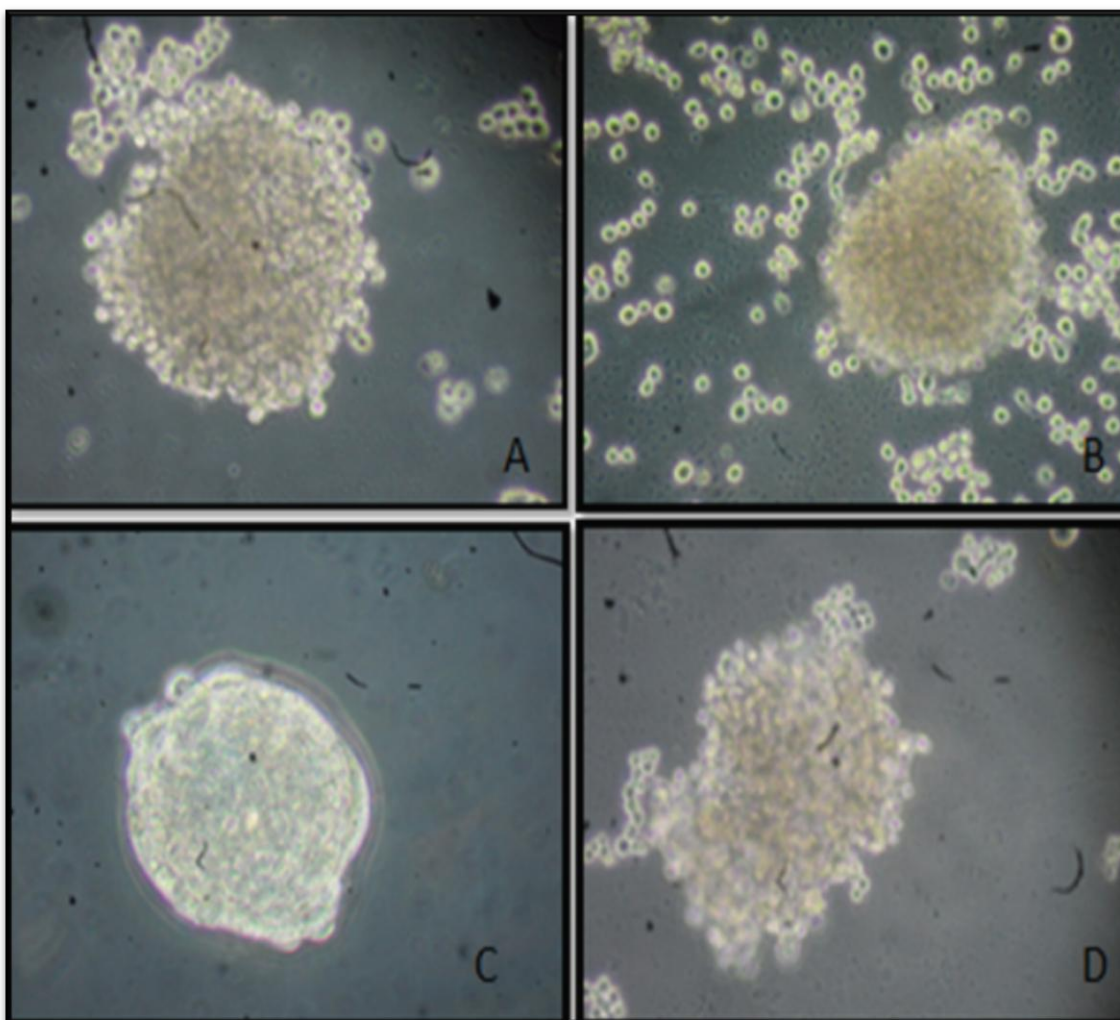


Figura 5. Formación de esferas a partir de líneas celulares de CaCu. Se muestran esferas generadas a partir de Hela (A), SiHa (B), CaSki (C) y C-33 A (D) al día 10 de cultivo en medio Mammocult® suplementado (Stem Cell Technologies, Inc).

En la figura 5 se muestra la capacidad de las líneas celulares HeLa, SiHa, CaSki y C-33 A para formar esferas. Durante el ensayo de esferas se apreció que estos cultivos tienen un crecimiento exponencial y que las esferas generadas fueron similares a los cultivos de CSC reportados anteriormente. Sin embargo se observaron diferencias morfológicas entre los cultivos de cada línea celular. Se puede apreciar que las esferas generadas a partir de HeLa (A) y SiHa (B) presentan mayor homología entre sí, mientras las esferas de C-33 A (D) son más irregulares, comparadas con las esferas formadas a partir de HeLa, SiHa y CaSki. Las esferas generadas a partir de la línea de CaSki muestran ser mas uniformes en comparación con el resto de las líneas de CaCu.

7.2. Expresión de p63, CK17 y anexina II en cultivos en monocapa y cultivos de esferas.

Después de 10 días las células de los cultivos en esferas fueron recolectadas y disgregadas con EDTA, para evaluar por citometría de flujo la expresión de p63, CK17 y anexina II en los cultivos enriquecidos en CSC y progenitoras tempranas. Al mismo tiempo se analizó la presencia de las mismas proteínas en cultivos en monocapa de SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A con confluencia del 70%, mediante la misma técnica.

En la Figura 6 se muestra la expresión de p63 en las líneas SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A, tanto en cultivo en monocapa como en cultivo de esferas. La imagen revela que los cultivos en monocapa de las 4 líneas de CaCu expresan p63, al igual que los cultivos en esferas generados a partir de estas líneas celulares. Además la media de fluorescencia (Mean) que mostro que existe un incremento en el nivel de expresión en las unidades relativas de fluorescencia (UTR) dentro de una subpoblación de los cultivos de esferas de las líneas SiHa, HeLa y CaSki con relación a su expresión en los cultivos de monocapa.

En la figura 7 se observa la expresión de CK17 en SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A en condición de monocapa y en condición de esferas. Se aprecia que en condición de monocapa las líneas SiHa, HeLa y C-33 A mostraron un mayor desplazamiento de CK17, con respecto al isotipo, mientras en los cultivos en suspensión el desplazamiento fue positivo en las 4 líneas celulares de CaCu. El desplazamiento positivo de CK17 es mayor en los cultivos de esferas con relación al desplazamiento en monocapa. Sin embargo aunque el porcentaje de células es menor en esferas el nivel de expresión en estas poblaciones es mayor comparado con el nivel de expresión en monocapa, esto medido a través de las UTR, como se muestra en la figura. En la figura 8 se muestra la expresión de anexina II en SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A en monocapa y en esferas. En los cultivos en monocapa, anexina II mostró un desplazamiento positivo tanto en HeLa, como en SiHa y no así en las líneas CaSki y C-33 A, donde no se expresa desplazamiento alguno. En los cultivos en esferas el desplazamiento de anexina II con respecto al control de isotipo fue positivo en las cuatro líneas celulares y mayor con respecto al desplazamiento en monocapa. Además se observa que en las cervoesferas, el porcentaje de células que expresan anexina II es menor con respecto al porcentaje de células que expresan anexina II en monocapa.

p63

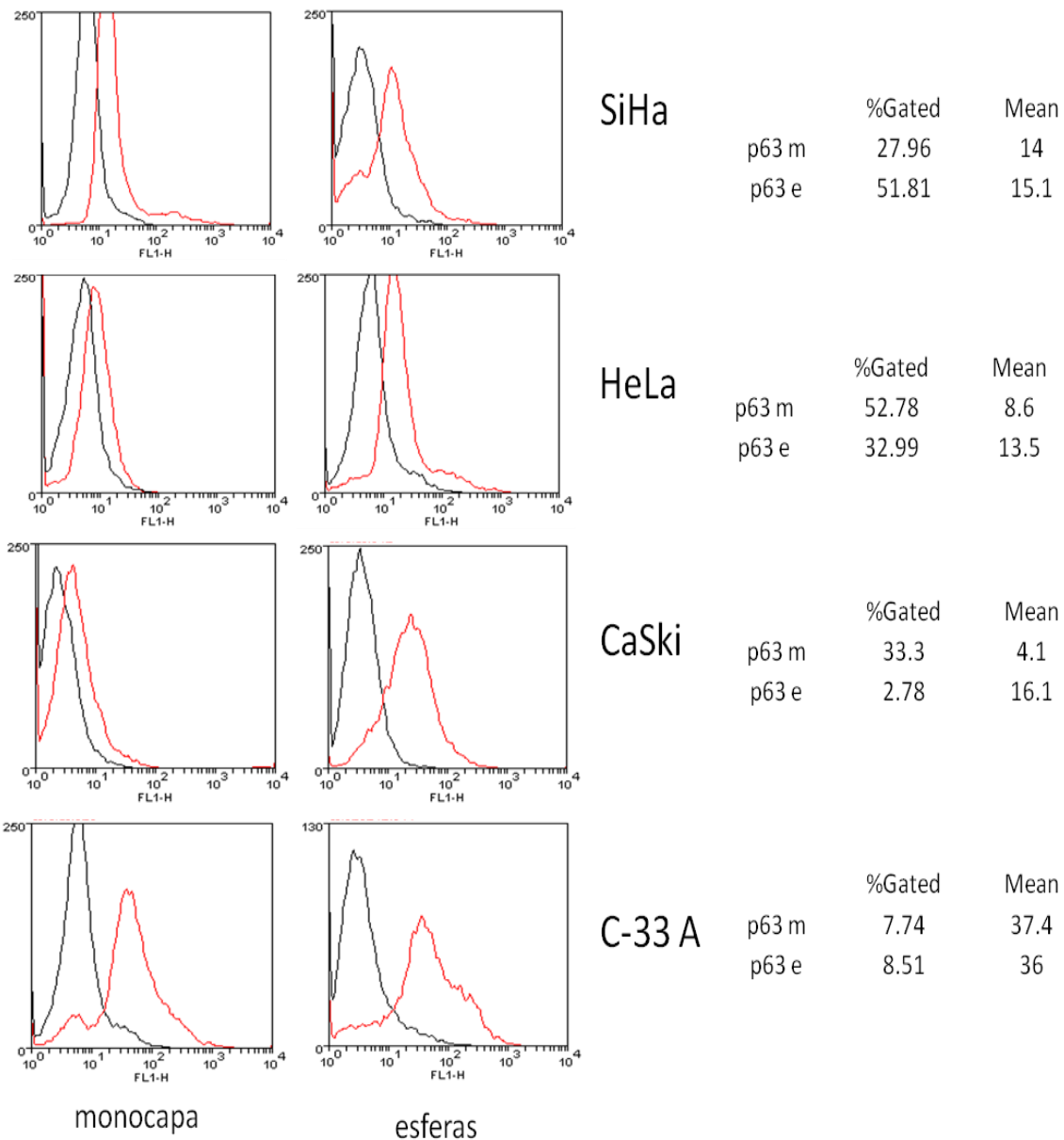


Figura 7. Expresión de p63 en líneas celulares de CaCu por citometría de flujo. Del lado izquierdo se muestran la evaluación de la expresión de p63 en las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A por citometría de flujo en monocapa y esferas. El histograma en rojo muestra la expresión de p63 y el negro el control de isotipo. Del lado derecho aparece el porcentaje de células incluidas en la región (% Gated) y la media de fluorescencia (Mean), tanto en monocapa (m) como en esferas (e) de p63. La lectura de las muestras se realizó en un equipo FACScan, se leyeron 10 000 eventos por muestra y para el análisis se utilizó el software Weasel.

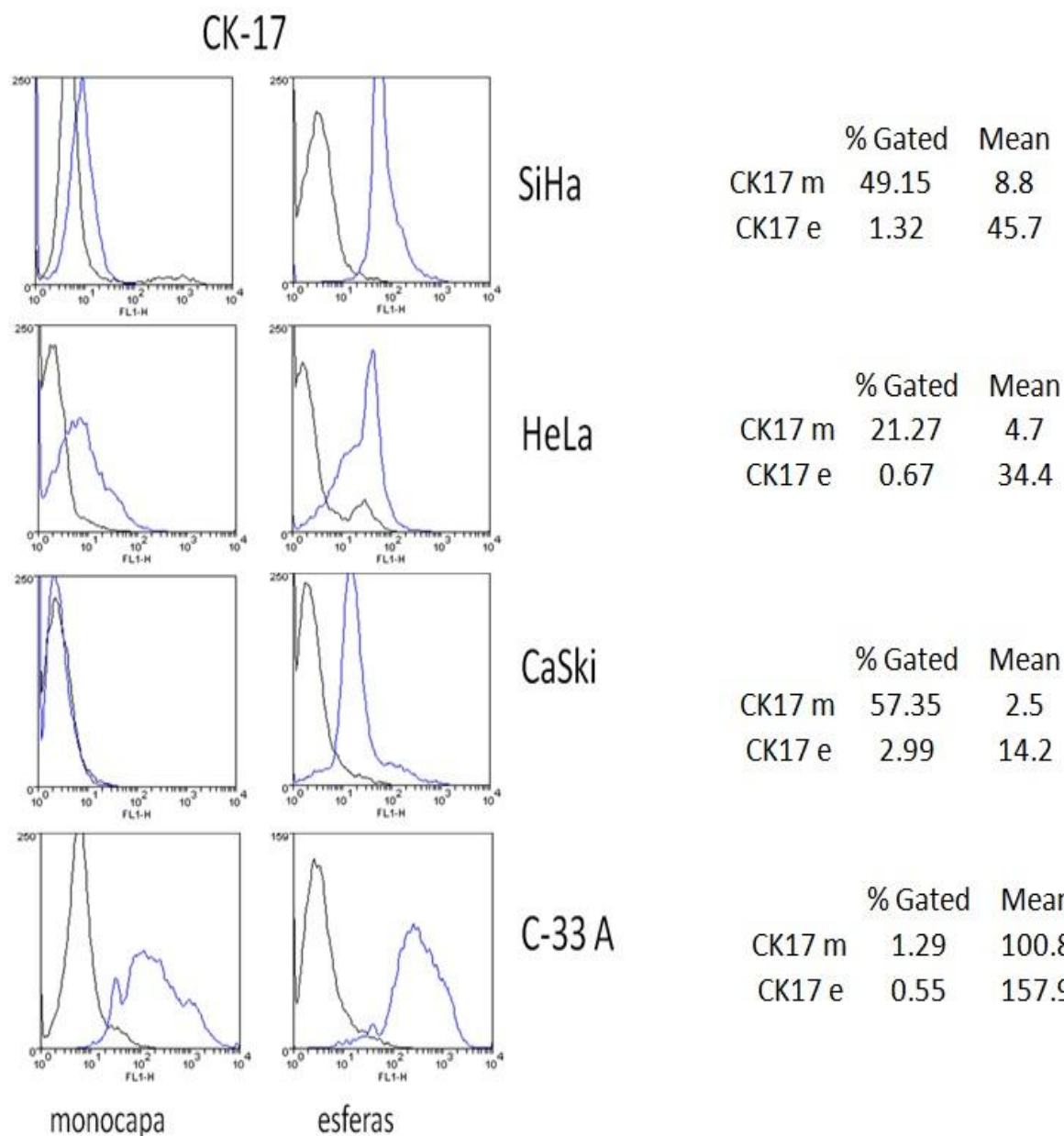


Figura 8. Expresión de CK17 en líneas celulares de CaCu por citometría de flujo. Del lado izquierdo se muestran la evaluación de la expresión de CK17 en las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A por citometría de flujo en monocapa y esferas. El histograma en azul muestra la expresión de CK17 y el negro el control de isotipo. Del lado derecho aparece el porcentaje de células incluidas en la región (% Gated) y la media de fluorescencia (Mean), tanto en monocapa (m) como en esferas (e). La lectura de las muestras se realizó en un equipo FACScan, se leyeron 10 000 eventos por muestra y para el análisis se utilizó el software Weasel.

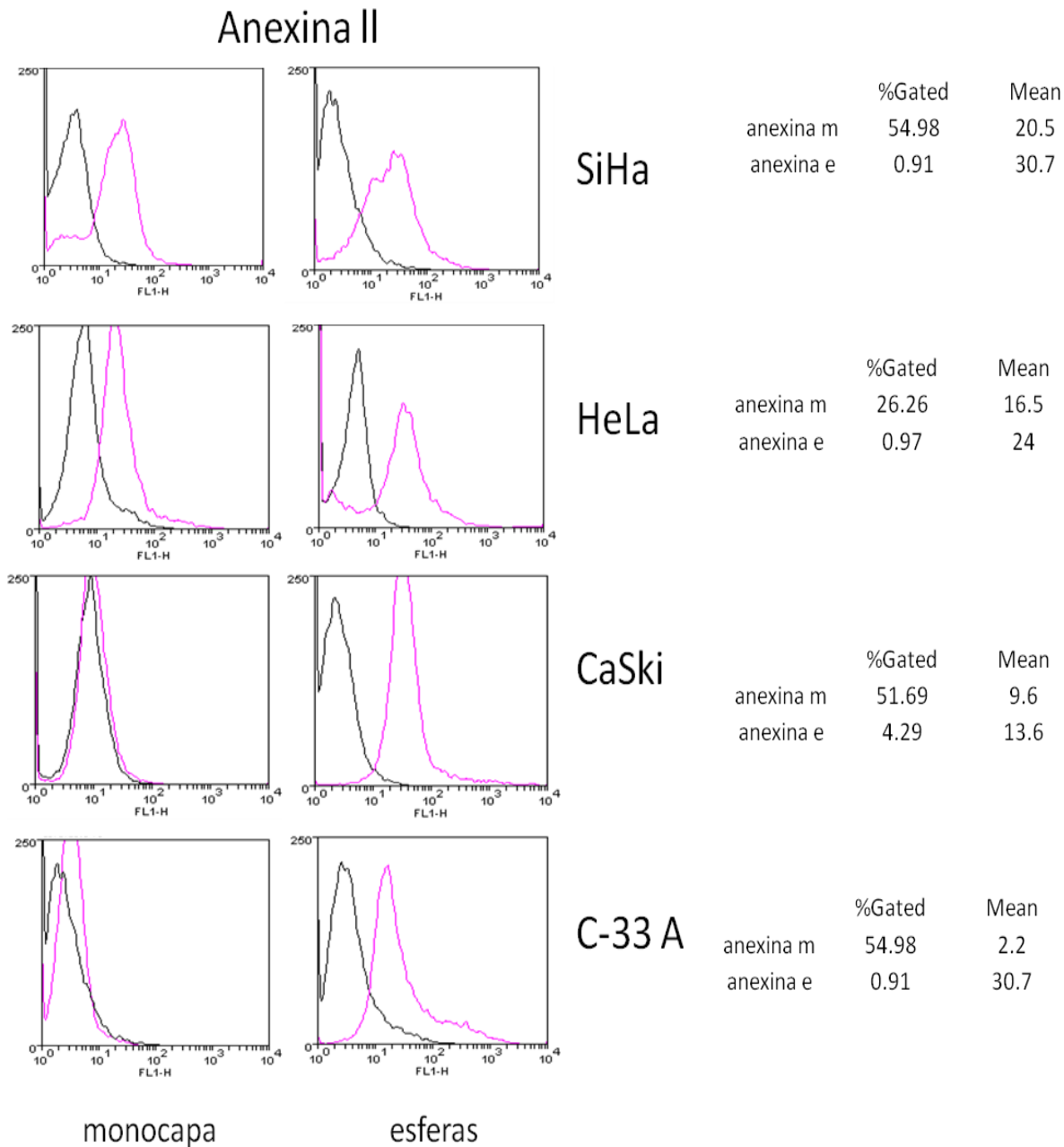


Figura 9. Expresión de anexina II en líneas celulares de CaCu por citometría de flujo.

Del lado izquierdo se muestran la evaluación de la expresión de anexina II en las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A por citometría de flujo en monocapa y esferas. El histograma en rosa muestra la expresión de anexina II y el negro el control de isotipo. Del lado derecho aparecen los valores del porcentaje de células incluidas en la región (% Gated) y la media de fluorescencia (Mean), tanto en monocapa (m) como en esferas (e). La lectura de las muestras se realizó en un equipo FACScan, se leyeron 10 000 eventos por muestra y para el análisis se utilizó el software Weasel.

7.3 Expresión de p63, CK17 y anexina II en muestras de pacientes.

Después de haber analizado la expresión de p63, CK17 y anexina II en líneas celulares, y observar que si se expresaban tanto en monocapa como en esferas se evaluó su expresión en muestras de pacientes, para ver si este patrón de expresión se repetía en biopsias. Se obtuvieron 3 muestras de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología que no habían recibido ningún tratamiento y de las cuales desconocíamos el diagnostico. Después de ser lavadas con PBS-antibiótico, las muestras se disgregaron mecánicamente y se evaluó la expresión de p63, CK17 y anexina II por citometría de flujo siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para las líneas celulares. Después de analizar la expresión de p63, CK17 y anexina II, se obtuvo el diagnostico reportado para cada paciente, con el fin de realizar una mejor correlación.

En la figura 9 se observa la expresión de p63, CK17 y anexina II por citometría, en las muestras de pacientes analizadas. En todas las muestras de pacientes, se muestra una subpoblación que expresa p63, CK17 y anexina II. Los niveles de p63 y CK17 muestran ser similares entre las muestras diagnosticadas como carcinoma epidermoide y la muestra diagnosticada como pólipos endocervicales, que en un tumor benigno. Sin embargo anexina II mostro una mayor expresión en las muestras de carcinoma epidermoide y casi nula en la muestra del tumor benigno.

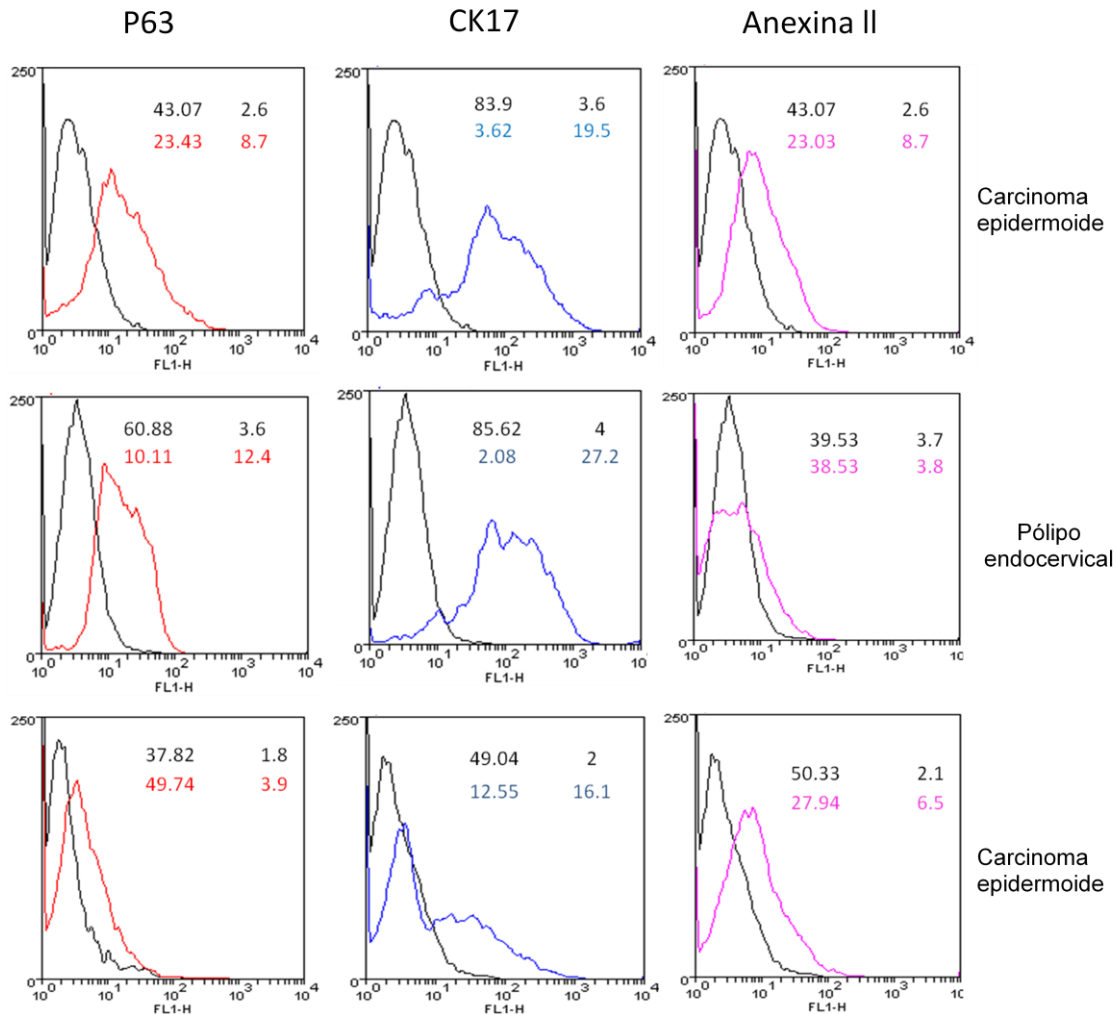


Figura 9. Expresión de las proteínas CD49f, p63, CK17 y anexina II en cultivos primarios de CaCu. Se muestra el análisis de la expresión de las proteínas p63, CK17 y anexina II en muestras de paciente, a través de citometría de flujo. Los histogramas en color muestran la expresión de p63, CK-17 y anexina II en las muestras de pacientes analizadas respecto a su control de isotipo mostrados en los histogramas en negro en cada uno de los ensayos. Dentro de cada histograma aparecen del lado izquierdo los porcentajes de células incluidas en la región y del lado derecho la media de fluorescencia, en negro aparecen los valores del isotipo y en color los de cada proteína. La lectura de las muestras se realizó en un equipo FACScan y para el análisis se utilizó el software Weasel y se leyeron 10,000 eventos por muestra. Dentro de cada histograma se muestra del lado izquierdo los valores correspondientes al % de células incluidas y del lado derecho la media de fluorescencia, en negro los valores del isotipo y en color los valores de la proteína.

7.4. Evaluación de tumorigenicidad *in vivo*.

El potencial oncogénico constituye la prueba de oro para la evaluación de las CSC. Para conocer el potencial oncogénico de las células obtenidas de los cultivos en esferas se inocularon en ratones atímicos, de cinco semanas de edad. Se inyectaron 1×10^3 , 1×10^4 y 5×10^5 células obtenidas de esferas, siempre comparando contra la misma cantidad de células crecidas en monocapa.

En la figura 10 se observa que las células obtenidas de los cultivos en esferas generaron tumores en el 100% de los ratones inoculados (2 de 2) con 5×10^5 células, después de 11 días y el mismo número de células en monocapa no genero tumor, a un después de dos meses. El control positivo genero tumor a los 13 días con 1 millón de células en monocapa. La inoculación de 1×10^3 y 1×10^4 células obtenidas de los cultivos enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas no generaron tumores en los ratones analizados.

A

Células inoculadas	HeLa monocapa	HeLa esferas
1×10^3	0/2	0/2
5×10^4	0/2	0/2
5×10^5	0/2	2/2

B



Figura 10. Evaluación de la tumorigenicidad de las cervoesferas. Se inocularon en ratones *nu/nu* de cinco semanas de edad 1×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 células obtenidas de los cultivos en suspensión. Al mismo tiempo se inocularon 1×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 células obtenidas de monocapa. A) En la tabla se indica el número de tumores generados en cada condición. B) Se muestra el tumor obtenido después de 11 días de la inoculación con 5×10^5 células obtenidas de los cultivos en esferas.

8. DISCUSIÓN.

La búsqueda de marcadores definidos para las CSC de cérvix resulta fundamental para el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas dirigidas a las CSC. Dado que las CSC y las células troncales normales comparten algunos marcadores es posible que marcadores que han sido reportados para células troncales epiteliales también se expresen en CSC de cérvix, basados en reportes previos se evaluó p63, CK17 y anexina II en líneas celulares, cultivos enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas y muestras de pacientes como posibles marcadores de CSC de cérvix.

Las líneas celulares representan un modelo *in vitro* adecuado para el estudio del cáncer debido a que mantienen la heterogeneidad del tumor del cual fueron aisladas y representan muchas ventajas en su manipulación con respecto a los modelos *in vivo*. La evaluación de p63, CK17 y anexina II en cultivos en monocapa de las líneas de CaCu reveló que p63 se expresa en las cuatro líneas celulares, CK17 en las líneas SiHa, HeLa y C-33 A y anexina II en SiHa y HeLa. En el 2004 se publicó el primer estudio extenso del perfil proteómico de la línea celular HeLa, en el cual se reportó la expresión de anexina II y CK17 (p63 no aparece entre las proteínas analizadas) (Fountoulakis *et al*, 2004), que correlaciona con lo encontrado en este trabajo. Sobre las líneas SiHa, CaSki y C-33 A no se tienen reportes sobre la expresión de p63, CK17 y anexina II. Sin embargo en SiHa y HeLa, la expresión de anexina II solo en las líneas concuerda con reportes donde su expresión ha sido correlacionada con líneas celulares de mama altamente invasivas (Sharma *et al*, 2006). En cuanto a la expresión de CK17 solo en las líneas SiHa, HeLa e inesperadamente en C-33 A, podría estar indicando que en estas líneas existe un mayor número de células de reserva y células metaplasicas inmaduras, sin embargo esto queda sujeto a comprobación.

A partir de los cultivos en monocapa se generaron cultivos enriquecidos de CSC, utilizando el medio Mammocult®. Este medio puede inducir la generación de esferas a partir de células epiteliales como lo son SiHa, HeLa, CaSki y C33-A. El

crecimiento en suspensión y la generación de cuerpos esferoides se considera una característica común de las células troncales, que muestra la autorenovación.

El ensayo de esferas reveló que a diferencia de HeLa, SiHa y C33-A, CaSki forma agregados mas definidos haciendo imposible observar a cada una de las células que la conforman. En relación al tiempo las cervoesferas de CaSki comienzan a mostrarse desde el tercer día, en comparación con las cervoesferas de Hela, SiHa y C-33 A que se forman al sexto día. Esta observación correlaciona con lo mostrado por Bortolomai *et al*, quienes reportaron que CaSki presenta una mayor capacidad de formar esferas.

En cuanto a la evaluación de p63, CK17 y anexina II en los cultivos enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas, se observó que dentro de las cervoesferas generadas a partir de las cuatro líneas celulares, existe una subpoblación celular positiva a la presencia de las proteínas p63, CK17 y anexina II. La presencia de p63 y CK17 en estas células esta correlaciona con la propuesta de ambas proteínas como posibles marcadores de células troncales de tejido cervical y con lo reportado por Feng y colaboradores en el 2009, quien realizó la primera caracterización de una población con características de CSC a partir de tumores de cérvix y observó que esta población fue positiva a CK17.

La presencia de p63 en la subpoblación de CSC y progenitoras tempranas, concuerda con que p63 es un factor transcripcional sobreexpresado en múltiples tipos de canceres entre ellos el CaCu y que participa en el mantenimiento del fenotipo de células troncales del cáncer (Boldroup *et al*, 2007). El anticuerpo utilizado en este trabajo reconoce a la isoforma Δ Np63, la cual se expresa en niveles altos selectivamente en células basales del epitelio estratificado y glandular. Además se ha visto regula la expresión de citoqueratinas e inducé la expresión del inhibidor de la diferenciación Id-3, con lo que contribuye a un fenotipo indiferenciado (Higashikawa *et al*, 2009).

La presencia de anexina II en el cultivo de esferas de anexina II era esperada dado que el cultivo de esferas permite obtener poblaciones enriquecidas con CSC y

progenitoras tempranas, las cuales han sido identificadas como las responsables de la agresividad de los tumores. Además, la presencia de este receptor, en los cultivos en monocapa y en los cultivos de CSC y podría indicar que esta proteína podría ser parte del mecanismo de entrada del VPH para infectar a las células basales del cérvix.; debido a que se ha sugerido que anexina II participa en la endocitosis mecanismo por el cual el VPH entra a la célula e inicia el proceso infeccioso.

El análisis de la expresión de p63, CK17 y anexina II en cultivos enriquecidos de CSC y progenitoras tempranas y líneas celulares de CaCu, reveló que existe un aumento de expresión de estas proteínas en los cultivos en esferas con respecto a los cultivos en monocapa de las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A. Los resultados obtenidos en este trabajo más los reportados por López y colaboradores en el 2012, indican el uso de CD49f, p63, CK17 y anexina II en la búsqueda de marcadores de CSC de cérvix. Sin embargo, para confirmar el papel de p63, CK17 y anexina II como posibles marcadores de CSC de cérvix es necesario realizar una separación de las células que expresan estas proteínas, de manera individual o combinada, para posteriormente inocularlas en ratones inmunosuprimidos y comprobar su tumorigenicidad.

Por último se observó que las células C-33 A (negativas a VPH) al igual que SiHa (VPH 16), HeLa (VPH 18) y CaSki(VPH 16) muestran ser positivas a p63, CK17 y anexina II, mostrando que su expresión es independiente del VPH.

En cuanto a la expresión de p63, CK17 y anexina II en nuestro grupo de muestras de pacientes, se observa que todas fueron positivas a la expresión de CK17, p63 y anexina II. La expresión de CK17 y p63 es semejante en las tres muestras a pesar de que dos están diagnosticadas como carcinoma epidermoide y otra como pólipo endocervical, un tipo de tumor benigno. Sin embargo si se observó diferencias en cuanto a los niveles de expresión de anexina II, siendo mayores en las dos muestras diagnosticadas como carcinoma epidermoide. Estos datos concuerdan con todos los reportes donde se ha observado la expresión de p63 (Wang *et al*, 2001), CK17 (Regauer and Reich, 2007) y anexina II (Hellman *et al*,

2009) en muestras de pacientes con CaCu y donde se ha visto una correlación entre el grado de expresión de estas proteínas y el grado de avance de la lesión. Sin embargo no podemos establecer conclusiones a partir de este grupo de muestras debido a que representan un número estadísticamente no representativo. Además resultaría muy importante analizar otro tipo de muestras de tumores benignos (posiblemente de adenomas, miomas, fibromas, etc.) para observar posibles diferencias en la expresión de p63 y CK-17 que permitan esclarecer la relación con su expresión en este tipo de muestras.

El que la expresión de p63 y CK-17 en las muestras de pacientes se haya mostrado similar tanto en las muestras de cáncer como en la muestra de tejido normal, no resulta motivo suficiente para descartar a estas proteínas como posibles marcadores de CSC de cérvix, debido a que como ya se ha visto en otros tipos de tumores, por si sola una sola proteína no puede definir la población de CSC de un tejido específico. Es por eso que en la identificación de estas las subpoblaciones de CSC se utilizan la combinación de varios marcadores.

En este trabajo demostramos que las células derivadas de las cervoesferas son tumorigénicas, favoreciendo la teoría de que en las esferas existe un enriquecimiento de las CSC. Los ratones *nu/nu* o *nude* (desnudos, por su carencia de cabello) presentan una deficiencia de la función del timo. Por falta de respuesta de los linfocitos T, estos ratones no rechazan células de otras especies. Las esferas obtenidas generaron tumores en estos ratones, indicando que poseen potencial de CSC. En este trabajo observamos la generación de tumores con la inoculación de 5×10^5 células obtenidas de los cultivos en esferas en solo 11 días, mientras Feng reportó la generación de tumores en ratones *nu/nu* después de 10 semanas con 1×10^5 de células crecidas en suspensión. La diferencia entre los tiempos de generación de tumores debe ser debido al número de células inoculadas.

9. CONCLUSIONES.

- Las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A tienen la capacidad de crecer en suspensión empleando el medio de crecimiento Mammocult®.
- Los cultivos de esferas de las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A presentan una subpoblación con mayor expresión de p63, CK17 y anexina II con respecto a la monocapa.
- Las muestras de pacientes expresan p63, CK17 y anexina II. Anexina II tiene una mayor expresión en las diagnosticadas como carcinoma epidermoide con respecto a la muestra de cérvix no maligno.
- Los cultivos obtenidos del ensayo de formación de esferas son más tumorigénicos que los de la monocapa.
- P63, CK17 y anexina II podría ser considerados en la búsqueda de marcadores de CSC de cérvix.

10. PERSPECTIVAS.

- Ampliar la caracterización de las CSC derivadas de las líneas celulares SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A.
- Realizar una separación de la población que expresa p63, CK17 y anexina II, de manera individual, en conjunto y en combinación con otros posibles marcadores.
- Evaluar la tumorigenicidad *in vivo* de estas nuevas subpoblaciones aisladas.

11. BIBLIOGRAFIA.

1. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(7):3983-3988.
2. Blanpain C, Lowry W, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* .118: 635-48.
3. Boldrup L, Coates P.J. Gu X,N y Lander K.(2007) DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4,6,14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. *Journal of. Pathology*. 213(4): 384-391.
4. Bonnet D and Dick. (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 3(7):730-7.
5. Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, De Cecco L, Castellano G, Zachetti A, Alison MR, Miotti S.(2010). Tumor initiating cells. Development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cel Cycle* 9 (5) 1194-1206.
6. Bouwens L and Rooman I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*. 85: 1255-70
7. Boyko V, Mudrak O, Svetlova M, Negishi Y, Ariga H, Tomilin N.(1994). A major celular substrate for protein kinases, annexin II, is a DNA-binding protein. *FEBS Letters*. 345(2-3):139-42.
8. Brownstein C, Deora AB, Jacovina AT, Weintraub R, Gertler M, Khan KM, Falcone DJ, Hajjar KA. (2004). Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. *Blood*. 103(1):317-324.
9. Chiang C.T., Chu WK, Chow S.E., Chen J.K. (2009). Overexpression of delta Np63 in a human nasopharyngeal carcinoma cell line downregulates CKIs and enhances cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology*. 219(1):117–122.
10. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U, Frisén J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 288:1660-3.
11. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. (2006). Cancer stem cells perspectives oncurrent status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*. 66(19):9339-9344.
12. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ and Maitland NJ. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*. 65(23):10946-10951.
13. Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. (2006). Cancer stem cells new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*. 12(5):443–454
14. Dalerba P, Cho RW and Clarke MF. (2007). Cancer Stem Cell: Models and Concepts. *Annual Review of Medicine*. 58:267-84
15. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(24) 10158-63.
16. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. (2003): Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 307(1):1-11.

17. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling mammary stem progenitor cells. *Genes & Development*.17(10): 1253-70.
18. Faris RA a Konkin T, Halpert G. (2001) Liver stem cells: apotential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artificial Organs*. 25: 513-21.
19. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H and Tian Z. (2009). Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology Reports* 22(5):1129-1134.
20. Flores ER. (2007) The Role of P63 in cancer. *Cell Cycle*. 6(3),300-304,
21. Fountoulakis M, Tsangaris G, Oh J, Maris A, Lubec G. (2004) Protein profile of the HeLa cell line. *Journal of Chromatography A*. 1038(1-2):247-65.
22. Frazer IH. (2004). Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews Immunology*.4:46-54.
23. Friel AM, Sergent PA, Patnaude C, Szotek PP, Oliva E, Scadden DT, Seiden MV, Foster R, Rueda BR. (2008) Functional analyses of the cancer stem cell-like properties of human endometrial tumor initiating cells. *Cell Cycle*. 7(2):242-249.
24. Gage FH, Ray J, Fisher LJ.(1995) Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS.*Annual Review of Neuroscience*; 18: 159-92
25. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. (2002).Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerthans cells:implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *International Journal of Cancer*. 97:654-9.
26. Ginestier C, Hur MH,Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha Ms, Dontu G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and predictor of poor clinical outcome. *Cell stem Cell*. 1(5) 555-67.
27. Graziano V, De Laurenzi V. (2011). Role of p63 in cáncer development. *Biochim Biophysic Acta*. 1816(1):57-66.
28. Guo X, Keyes WM, Papazoglu C, Zuber J, Li W, Lowe SW, Vogel H, Mills AA. (2009). TAp63 induces senecesce and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nature Cell Biology*. 11(12):1451-1457.
29. Haijar KA,Krishnan S.(1999). Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 9(5):128-38.
30. Haller H, de Groot K, Bahlmann F, Elger M, Fliser D. (2005). Stem cells and progenitor cells in renal disease. *Kidney International*. 68: 1932-6.
31. Hellman K, Alaiya AA, Becker S,Lomnytska M, Schedvins K, Steinberg W, Hellstrom A-C, Andersson S, Hellman U and Auer G. (2009). Differtial tissue-specific protein markers of vaginal carcinoma.
32. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(25): 15178-83.
33. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H, Ono S, Kamata N. (2009); DeltaNp63 alpha-dependent expression of Id3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 124(12):2837-2844
34. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T.(2008) Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical

- squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecologic Oncology*.108(3):598-602.
35. Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells and development*. 18(7):1093-108.
 36. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. (2005). Identification of bronchialalveolar stem cell in normal lung cancer. *Cell*. 121(6):823-35.
 37. Kitamura S, Yamasaki Y, Makino H. (2005). Establishment of renal stem/progenitor-like cell line from S3 segment of proximal tubules in adult rat kidney. *Kidney International*. 68: 1966.
 38. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, Lotz B, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M. (1999). Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Research*. 59 (24):6132-6236.
 39. Koster, M.I., Kim, S., Mills, A.A., DeMayo, F.J. and Roop, D.R. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & Development*. 18(2)126-131.
 40. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research*. 67(3)1030-7.
 41. López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia Carlos y García-Carrancá A. (2012). Cancer- initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 12:43.
 42. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ.(2004). Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Research*. 24(2B):771–775.
 43. Masaki T, Tokuda M, Fujimura T, Ohnishi M, Tai Y, Miyamoto K, *et al.*(1994) Involvement of annexin I and annexin II in hepatocyte proliferation: can annexins I and II be markers for proliferative hepatocytes. *Hepatology*. 20(2):425-35.
 44. McCulloch EA, Till JE. (2005). Perspectives on the properties of stem cells. *Nature Medicine*. 11:(10)1026-1028.
 45. Mundt HM, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T, Muller M.(2010). Dominant negative (DeltaN) p63alpha induces drug resistance in hepatocellular carcinoma by interference with apoptosis signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 396 (2):335–341.
 46. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, De San Jose S, Hammouda D, Shah K U, Meijer CJ. (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *International Journal of Cancer*. 111(2):278-85.
 47. Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. (2010) The Role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. *Celular and Molecular Biology Letters*. 16(2):296-327.
 48. Nekulova M, Holcakova J, Coates P, Vojtesek B. (2011). The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells. *Cellular & Molecular biology letters*. 16(2) 296-327.
 49. Ortiz-Sánchez E, Chávez-Olmos P, Piña-Sánchez P, Salcedo M, Garrido Efraín. (2007). Expression of the costimulatory molecule CD86 but not CD80 in keratinocytes of normal cervical epithelium and HPV-16 positive low squamous Intraepithelial lesions. *International Journal of Gynecological Cancer*.17(3):571-8.

50. Ortiz-Sánchez Elizabeth, González-Montoya José Luis, Langley Elizabeth, García-Carrancá Alejandro. (2012). *Cancer Stem Cells in Solid Tumors, Markers and Therapy*. Editorial Springer, N.Y. USA, pp:627.
51. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cells properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(3):973-8.
52. Prosper F, Verfaillie C. (2003). Células madre adultas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 26(3):345-356.
53. Ramanakumar A, Goncalves O, Richardson H, Tellier P, Ferenczy A, Coutlée F, Edua Franco E. (2010). Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infectious Diseases*. 10:326.
54. Regauer S, Reich O. (2007). Ck-17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology*. 50:629-635
55. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859):105-11.
56. Rosenzweig A. (2005) Circulating endothelial progenitors—cells as biomarkers. *New England Journal of Medicine*. 353: 1055-7.
57. Sabbisetti V, Di Napoli A, Seeley A, Amato AM, O'Regan E, Ghebremichael M, Loda M, Signoretti S. (2009). p63 promotes cell survival through fatty acid synthase. *PLoS One*. 4(6):5877.
58. Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V. (2005) Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *Journal of Biological Chemistry*. 280(21):20833-41.
59. Setoguchi T, Taga T, Kondo T. (2004) Cancer Stem Cells Lines. *Cell Cycle*. 3(4) 414-5.
60. Setoguchi T, Taga T, Kondo T. (2004). Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle*. 3(4):414-415.
61. Sharma M, Koltowski L, Rothman VL, Tuszynski GP, and RTO, Sharma MC (2006). Angiogenesis Associated Protein Annexin II in Breast Cancer: Selective Expression in Invasive Breast Cancer and Contribution to Tumor Invasion and Progression. *Experimental and Molecular Pathology*. 81(2):146-56.
62. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 432(7015):396-401.
63. Stack Ms, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA. (1999). Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochemical Journal*. 340(1):77-84
64. Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL, Leung ML, El-Naggar A, Creighton CJ, Suraokar MB, Wistuba I, Flores ER. (2010). TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature*. 467(7318):986-90.
65. Swairjo MA, Seaton BA. (1994). Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*. 23:193-213.
66. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer E, Maclaughlin DT Donahoe PK. (2006). Ovarian cancer side

- population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(30):11154-11159.
67. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P.(2005). Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.102: 8692-7.
 68. Visvader JE and Lindeman G. (2008) Cancer Stem Cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved question. *Nature Review Cancer*. 8,755-768
 69. Wang S, Hildesheim A.(2003) Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31:35-40.
 70. Wang TY, Chen BF, Yang YC, Chen H, Wang Y, Cviko A, Quade BJ, Sun D, Yang A, McKeon FD and Crum CP.(2001). Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases. *Human Pathology*. 32: 479-486.
 71. Webb A, Li A, Kaur P. (2004). Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*. 72: 387-95.
 72. Weissman IL. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100:157-68.
 73. Woodworth C, Simpson S. (1993) Comparative Lymphokine Secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. *American Journal of Pathology*.142(5) 1544-1555
 74. Wu G, Osada M, Guo Z, Fomenkov A, Begum S, Zhao M, Upadhyay S, Xing M, Wu F, Moon C, Westra WH, Koch WM, Mantovani R, Califano JA, Ratovitski E, Sidransky D, Trink B. (2005) DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer, *Cancer Research*. 65(3):758–766.
 75. Zammit P, Beauchamp J. (2001). The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell. *Differentiation*. 68: 193-204.
 76. Zimmermann U, Woenckhaus C, Pietschmann S, Junker H, Maile S, Schultz K et al.(2004) Expression of annexin II in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome. *Virchows Archiv*. 445(4):368-74.
 77. Zucchi I, Astigiano S, Bertalot G, Sanzone S, Cocola C, Pelucchi P, Bertoli G, Stehling M, Barbieri O, Albertini A, Schöler HR, Neel BG, Reinbold RA, Dulbecco R. (2008), Distinct populations of tumor-initiating cells derived from a tumor generated by rat Mammary cancer stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (44):16940–16945.